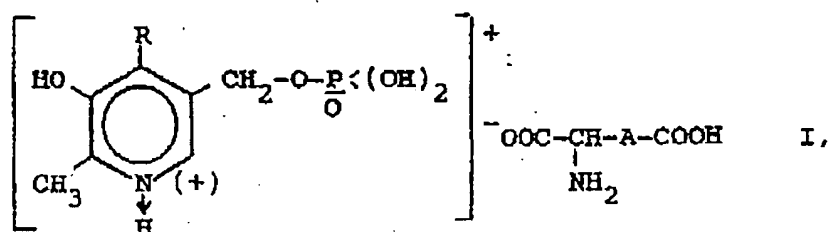


2461742.

STEIGERWALD Arzneimittelwerk G. m. b. H., Darmstadt,  
Havelstr. 5

Pyridoxine-derivative, as well as its production and utilization.

The subject of the present discovery are the enteral and parenteral deliverable salts of pyridoxin-5'-phosphoric acid ester with aminoacids of the general formula I.



Where R is the hydroxymethyl- ( $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ), Aminomethyl- ( $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ) or the formyl- ( $-\text{CHO}$ ) group and A means methylene ( $-\text{CH}_2-$ ) or ethylene ( $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$ ), the sequence  $-\text{A}-\text{COOH}$ , which can also be replaced by the Methyl ( $-\text{CH}_3$ ), as well as by the sodium-, magnesium-, and calcium- salts; the production of these combinations and their utilization for the prophylaxis and therapy of metabolic malfunctions, especially on their influence on lipid- and cholesterolin regulation.

The industrial Western countries have seen a rapid increase of metabolic disorders during the past 25 years, especially disorders of fat metabolism, whose main cause is over feeding accompanied by lack of exercise. There is a gradual increase of the blood levels of specific lipids, which raise the risk of arteriosclerosis and heart and peripheral vessel disease. The fats become very small droplets in the circulatory system (= chylomikronen) which have a film of protein (Alpha- or Beta-globulin) which transports and stabilizes them.

2461742.

GERMAN FEDERAL REPUBLIC

GERMAN PATENT OFFICE

Disclosure Document 24 61 742

File number            P 24 61 742.3  
Registration date      28 12 74  
Disclosure date        08 07 76

Union priority

---

Designation: Pyridoxine derivatives as well as their  
production and utilization.

Person who registers: Steigerwald Arzneimittelwerk, GmbH,  
6100, Darmstadt

Inventor: Eurich, Rolf, Dr. med., dent, 6101 Trautheim.

---

DT 24 61 742 A1.

Through the consumption of abundant meats there is often a copious supply of cholesterol, which is already plentifully biosynthesized by the liver. The natural regulatory mechanism of cholesterol levels is damaged by very fatty foods with the resulting permanent raising of the plasma cholesterol. The difficult to dissolve cholesterol accumulates on the walls of blood vessels such as the aorta, corneas and lenses of the eyes, etc. Increased blood cholesterol levels are responsible, at least in part, for the production of arterial hardening. Hypercholesterinaemia is a hyperlipaemia which is regularly associated with impaired metabolism which, for example, can be very marked in diabetes mellitus.

The pathologically different, but symptomatically similar disease picture of the hyper-triglyceridemia = hyperlipaemia, that is to say, the clouding of the serum through chylomikronen (neutral fat rich droplets with a diameter of up to 1  $\mu$ m), and the hypercholinesteraemia, that is to say the raising of the cholinesterin content in the blood plasma to over 200 mg % come under the heading of hyperlipoproteinaemia or, for example, hyperlipidaemia (Pschyrembel, clinical dictionary).

Until now the present treatment of hyperlipoproteimia is with alpha- (p-chlorophenoxy)- isobutyric acid ester, salts of alpha- (p-chlorophenoxy)- isobutyric acid and nicotinic acid, as well as nicotinic acid derivatives and numerous combined preparations which are used.

Alpha- (p-chlorophenoxy)- isobutyric acid and its derivatives are today, in retrospect, seen as effective and of long term tolerance and of excellent therapeutic value for this "indikation" (=collection of symptoms). It cannot, however, be overlooked that it is an artificial body-foreign chemical, which is not to be found during normal metabolism. It may, besides, release p-chlorophenol with time, and which includes chlorine in a stable aromatic condition. Against the wide use of such a foreign substance over a long period of time, it must be systematically considered and stated that the dosages of 1500 to 2000 mg/day is far too high.

The use of alpha- (p-chlorophenoxy)-isobutyric acid derivatives is brought into question by the existence of liver damage, kidney insufficiency, pregnancy, lactation, and in children. It can cause diarrhoea, alopecia (loss of hair), and "Leukopenie", and lead to an increase in the serum transaminase, for example the creatinephosphokinase, which

demand the avoidance of this medication. The dosages of anticoagulants must eventually be reduced in those who are medicated with alpha-(p-chlorphenoxy)-isobutyric acid derivatives. Nausea, weight increase, potency reduction, or myositis-similar syndrome can also appear which can even compel the avoidance of these medication.

Nicotinic acid and nicotinic acid derivatives, which were at one time of significance for reducing lipids, lead to skin reddening, abnormal liver functions, and worsening of existing diabetes.

In contrast to these synthetic medication there is vitamin B6: pyridoxol, pyridoxamin, and pyridoxal and their derivatives which are natural and essential nutritional ingredients. Pyridoxin is in close relationship to pyridoxamin-5-phosphate, and to pyridoxal-5-phosphate, which play an important role as co-enzyme in the aminoacid and transaminase reaction.

Pyridoxal-phosphate is a part of the alpha-glucan phosphorylase. It is not clear whether vitamin B6 takes part in the metabolism of fats. An influence on the fatty acid metabolism on the arterial walls occurs, and thus an anti-arteriosclerosis action has been attributed to it. There appears to be a slight raising of the triglyceride levels in the blood of rats at high dosages which suggests an anti-arteriosclerosis action of vitamin B6. It should also be good for the utilization of fats and for fat deposits, and is of decided significance for the protein, that is to say, aminoacid metabolism, and has an important function in the formation of carbohydrates from proteins. The phenomena also contradict an influence of the fat metabolism in the sense of a function of hypolipidaemia or hypocholesteremia.

Of the aminoacids (glutamic acid and aspartic acid) there is not known a hypolipidemia or a hypocholesteremia function. In animal research on the rat, the aminoacids influence neither the level of triglycerides nor the cholesterol levels in the blood.

In contrast however, it was found that the pyridoxin derivatives of the general formula I on page 2, can exert a surprisingly fast and strong hypolipidemic and hypocholesteremic effect in people, to an extent which has only been achieved with alpha-(p-chlorphenoxy)-isobutyric acid derivatives. In treatment with pyridoxin-derivatives of the general formula I, undesirable side effects were never

seen. These compounds furnish the ideal means for lowering fat. They can, therefore be used in all cases without hesitation, in contrast to the alpha- (p-chlorphenoxy)-isobutyric acid derivatives whose counterindications, or undesirable secondary actions and symptoms, indicate that they can only be used under suitably strict supervision.

The compounds of the general formula can be administered enterally as tablets, capsules, coated tablets, granules, syrups, suspensions, and even as suppositories, as well as by injection.

For treatment and prophylactic measures for the course of lipid-budget and metabolic derailment, as well as blood vessel alterations due to arteriosclerosis or to diabetes, damage to the retinal blood supply and arterial inflammation, an average daily dose of 80 to 500 mg of active material is needed. The material is taken with the main meal of the day.

#### Pharmacological tests.

The pyridoxal-5'-phosphoric acid ester-glutamate and the -aspartate are extraordinarily well tolerated. The LD50 by oral administration for mice of pyridoxal-5'-phosphoric acid-ester glutamate is 6540 mg/kg of mouse.

Similar good tolerance is also found to the remaining combinations belonging to this group. Because of their close relationship to, that is to say, belonging to the vitamin B6 group on the one hand, and the natural essential aminoacids on the other hand, the harmlessness of these combinations is guaranteed. Also during long term therapy there are no side effects from secondary actions.

#### Clinical tests

Twenty patients with high triglyceride or neutral fat levels and with normal or high cholesterin levels in the blood serum, were administered daily oral doses of 180 mg of pyridoxal-5'-phosphoric acid ester-glutamate in tablet form.

The patients were divided into two groups. The first group of 7 patients (1) were treated for 21 days and the second group (2) of 13 patients were treated for 84 days. The blood levels of triglycerides, of neutral fats and cholesterin were determined before, during, and at the end of the treatment.

Table 1.

	Triglyceride		Cholesterol	
	Before treatm.	After treatm.	Before treatm.	After treatm.
Av. value mg %	406.57	217.14	281.14	229.71
Lowering in %		46.59 %		18.29 %
S.D.	107.47	110.90	87.82	25.41
S.E.M.	40.62	41.91	33.19	9.60
Significance.		P<0.001	n.s. 0.10>P>0.05	
n = 7				

S.D. = Standard Deviation

S.E.M. = Standard Error of the Mean

Table 2-

	Neutral fat		After 12 weeks	Cholesterol	
	Before treatm.	After 8 weeks		Before treatm.	After 8 weeks
Av. value	286,92	178,42		264,84	238,46
Lowering in %		37,81 %			9,96 %
S.D.	168,38	81,67		54,24	51,28
S.E.M.	46,70	22,65		15,04	14,22
Significance:		P<0,01			P<0,005
	n = 13			n = 13	
Av. value*		179,06	123,55		237,50
Lowering in %			30,99 %		2,0 %
S.D.		78,69	39,84		53,43
S.E.M.		23,72	12,01		15,42
Significance:			P<0,02		0,10 > P > 0,05
	n = 11			n = 12	
Av. value	287,48		123,55	264,00	232,75
Lowering in %			57,02 %		11,83 %
S.D.	177,33		39,84	56,57	58,05
S.E.M.	53,46		12,01	16,33	16,75
Significance:			P<0,02		P<0,01
	n = 11			n = 12	

\*in mg%

The results of the biochemical determinations on the patients' blood were placed in Tables 1 and 2.

### Results

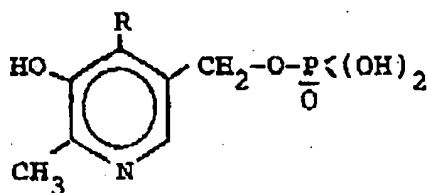
Group (1): See Table 1. With the administration of 180 mg of material per day there was within 21 days a lowering of the triglyceride levels to 189.4 mg%, which corresponded to a lowering by 46.6%. The previously high triglyceride values in the blood were significantly lowered ( $p < 0.001$ ). The cholesterol values in this group of patients were not, or were only very insignificantly raised, but were lowered 18.3%; however, this reduction was not statistically significant ( $0.10 > p > 0.05$ ).

Group (2): See Table 2. After 84 days the blood neutral fat levels were reduced by 57.02% and the blood cholinesterin levels were reduced by 11.83%. The reduction of the neutral fat levels were significant at 8 and also at 12 weeks ( $p < 0.01$ ). Also the reduction of the cholinesterin levels were also significant, being ( $p < 0.005$ ) at 8 weeks and ( $p < 0.01$ ) at 12 weeks, when compared to the levels before treatment which were mostly of above normal values.

Similar results were also found for pyridoxol-5'-phosphoric acid ester-glutamate and pyridoxamine-5'-phosphoric acid ester-glutamate.

Also the corresponding aspartates produce a reduction of high fat and cholinesterin levels in plasma in trials on rats.

The procedure for the manufacture of the compounds previously defined by the general structure shown in formula I in the introduction, as well as their sodium-, magnesium-, and calcium-salts, is well indicated, and that a pyridoxin-5'-phosphoric acid ester of the general formula II



II



2461742.

where R indicates the hydroxymethyl-, the aminomethyl- or the formyl- groups as well as the sodium-, magnesium-, or calcium- salts thereof, or exchanged with the equimolar or near equimolar quantity of glutamic acid or aspartic acid.

The salts are usually produced in water or in an alcohol, or in an aprotish solvent (aprotish = non-polar ?).

Corresponding to the relative susceptibility of the eduction (educt = body disengaged from that in which it previously existed; Concise Oxford dictionary) and of the product, there is the salt formation at low temperatures in the region of 0 to 50 C and under strict exclusion of light.

#### EXAMPLES:

##### [A] THE PRODUCTION OF THE ACTIVE SUBSTANCE.

##### Example 1.

Pyridoxal-5'-phosphoric acid ester- glutamate. Mol. Wt.: 394.3

26.52 g (0.1 Mol.) of Pyridoxal-5'-phosphate monohydrate were placed at 40-50°C in a warm suspension of 14.7 g of glutamic acid in about 1.0 litre of water in complete darkness. The mixture was stirred until all was dissolved. Then the solution was completely evaporated in a vacuum at low temperature. The residue was then dried in a vacuum.

Yield: 39.4 g of an intensely yellow compound.

Melting point: cinders at 135 C, following gradual decomposition.

Solubility: slightly soluble in water and has a weak acidic reaction; soluble in methanol, a little soluble in ethanol, not soluble in chloroform, benzol, and benzene.

Spectrum: maximum width at 290-295 nm (in H<sub>2</sub>O).

##### Example 2.

Pyridoxal-5'-phosphoric acid ester- aspartate. Mol. Wt.: 380.3

26.52 g of Pyridoxal-5'-phosphate monohydrate were placed in a warm suspension of 13.3 g of aspartic acid in 600 ml of methanol and stirred until completely dissolved. The product was precipitated by addition of 1.2 litres of isopropanol, and was then filtered off and dried in a vacuum.

Yield: 30 g d.s. 79% of theoretical.

2461742.

Melting point: cinders at 135 C, following gradual decomposition.

Solubility: slightly soluble in water, soluble in methanol, difficult to dissolve in ethanol and in isopropanol. Not soluble in diethyl ether.

Spectrum: maximum width at 290-295 nm (in H<sub>2</sub>O).

The salts of Pyridoxal-5-phosphate are intense yellow coloured powders.

#### Example 3.

Pyridoxamin-5'-phosphoric acid ester- glutamate. Mol.  
Wt.: 395.3

24.8 g (0.1 Mol.) of pyridoxamin-5-phosphate [Peterson, et al., J. Amer. Chem. Soc. 76 (1954) 1701] were placed in a suspension of 14.7 g of glutamic acid in 1 litre of water, and stirred until completely dissolved and then completely evaporated under vacuum at low temperature,  
Yield: 26.3 g of a hygroscopic powder.

Solubility: slightly soluble in water, low solubility in the higher alcohols and most other organic solvents.

Analogues were also obtained:

Pyridoxamin-5'-phosphate-aspartate Mol. Wt.: 381.3

Both combinations are slightly soluble in water.  
The solutions react approximately neutral.

#### Example 4.

Pyridoxol-5'-phosphoric acid ester-glutamate. Mol. Wt.  
---

2.5 g Pyridoxol-5'-phosphate (2-methyl-3-hydroxy-4-hydroxy-methyl- 5-pyridinemethyl-phosphoric acid) [Peterson et al., J. Amer. Chem. Soc. 76 (1954) 1723] were placed in a solution of 1.47 g glutamic acid in water at 40-50°C under complete exclusion of light, and stirred long enough until completely dissolved. The water is finally removed by cold drying.

Yield: 4 g of white powder.

Solubility: slightly soluble in water, soluble in methanol, little soluble in the higher alcohols and most organic solvents.

#### [B] FORMULATIONS EXAMPLES.

2461742.

The materials described under [A] were manufactured for use as tablets, capsules, coated tablets, granulations, syrups, suspensions, suppositories, or as injections.

Example 5.

Tablets containing 60 mg each of pyridoxal-5'-phosphoric acid ester glutamate.

6000 g of pyridoxal-5'-phosphoric acid ester-glutamate were mixed with 2 lt. of starch paste, which contained 100 g of corn starch, in a kneading machine. When the damp mass became sticky, it was then mixed with some more dry starch. After this, the mass was placed in a granulation machine and dried in a vacuum. The finished granules were then mixed with 0.5 kg of corn starch and 25 g of magnesium stearate and pressed into tablets containing 60 mg of active substance. The tablets can also, finally, be coated.

Example 6.

Capsules containing 80 mg each of pyridoxal-5'-phosphoric acid ester glutamate.

The active ingredient was mixed with a little corn starch and magnesium stearate and then placed in capsules.

Example 7.

Injection solution at a rate of 100 mg of pyridoxal-5'-phosphoric acid ester glutamate per dose.

100 g pyridoxal-5'-phosphoric acid ester-glutamate were dissolved in 200 ml of water and the pH was adjusted to 7.0 +/- 0.2 with the addition of small amounts of sodium hydroxide solution, then passed through a filter with average pore diameter of 0.22  $\mu$ , and finally brought to a volume of exactly 300 ml under sterile conditions before filling ampules, each with 3 ml of solution and, finally, lyophilized. The ampules were then sealed. Before use, the lyophilized material was mixed with 2.5 ml of water and brought into solution by shaking. The solution was then taken up in syringes and used in intramuscular injections.

[C] Application example.

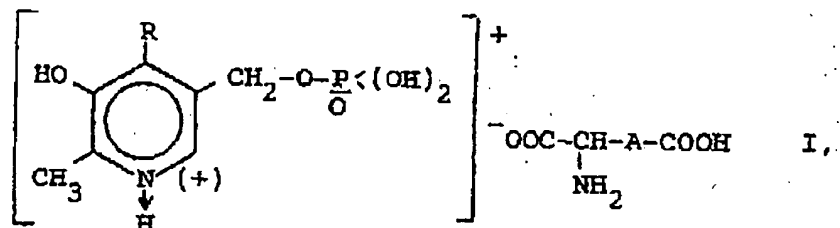
Pyridoxal-, pyridoxamin-, or pyridoxol-5'-phosphoric acid ester glutamate, or the corresponding aspartate, were used

2461742.

for treatment or prevention of hyperlipoproteinemia in daily dosages of 80 to 500 mg. Higher dosages do not show a better effect, so they are not useful. Usually, 150 to 250 mg per day administered orally in 2 or 3 portions as tablets, capsules, or coated pills at meal times. The outcomes of the treatments are presented on pages 5 onwards (of the translation) and in tables 1 and 2.

PATENT CLAIMS.

1. Salts of pyridoxin-5'-phosphoric acid ester with aminoacids of the general formula I:



where R is the hydroxymethyl-, aminomethyl-, or formyl-groups, and A indicates methylene-, or ethylene-groups, but the sequence -A-COOH can be replaced by -CH<sub>3</sub> as well as by sodium-, magnesium-, and calcium salts of this phosphoric acid ester.

2. Pyridoxal-5'-phosphoric acid ester-glutamate, as well as its sodium-, magnesium-, or calcium salts.
3. Pyridoxal-5'-phosphoric acid ester-aspartate.
4. Pyridoxamin-5'-phosphoric acid ester-glutamate or aspartate.
5. Pyridoxol-5'-phosphoric acid ester-glutamate, or aspartate.
6. The process for the manufacture defined in the Structure in Patent application 1, and thereby characterized as a pyridoxin-5'-phosphoric acid ester, or a sodium-, magnesium-, or calcium salt thereof exchanged with an equimolar, or nearly equimolar, quantity of glutamic acid, or aspartic acid.
7. Process according to Patent Application 7, therefore characterized that by change (reaction ?) in water, in an alcohol, or in an aprotisch (non-polar ?) solvent at 50 C or very slightly more does not, or essentially does not, react.

2461742.

8. Pharmaceutical preparations for enteral or parenteral treatment or prevention of hyperlipoproteinemia are therefore characterized that as an active ingredient has a pyridoxine-5'-phosphoric acid ester- glutamate or -aspartate of the general formula I in Patent Application 1, or its sodium-, magnesium-, or calcium salts contained therein.

9. Tablets, capsules, or suppositories suitable for therapeutic treatment of hypolipoproteinemia, therefore so characterized that they contain about 50 to 250 mg of the salts of pyridoxine-5'-phosphoric acid with glutamic or aspartic acids and contains suitable pharmaceutical carriers or binders.

⑤

Int. Cl. 2:

**C 07 F 9/65**

⑱ **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

C 07 D 213/66

A 61 K 31/675

DEUTSCHES PATENTAMT



DT 24 61 742 A1

⑪

# Offenlegungsschrift 24 61 742

⑫

Aktenzeichen: P 24 61 742.3

⑬

Anmeldetag: 28. 12. 74

⑭

Offenlegungstag: 8. 7. 76

⑳

Unionspriorität:

⑳ ㉑ ㉒

⑤④

Bezeichnung:

Pyridoxin-Derivate sowie deren Herstellung und Verwendung

⑦①

Anmelder:

Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH, 6100 Darmstadt

⑦②

Erfinder:

Eurich, Rolf, Dr.med.dent., 6101 Trautheim

DT 24 61 742 A1

NACHGEREICHT

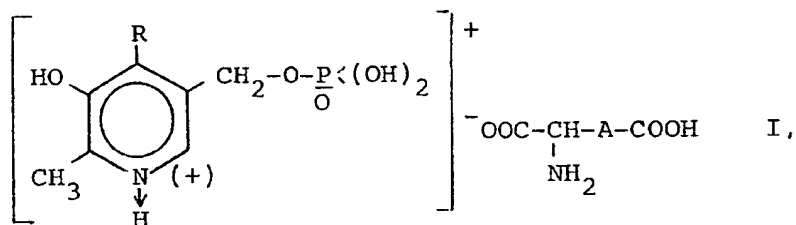
11.11.14

2461742

STEIGERWALD Arzneimittelwerk G.m.b.H., Darmstadt, Havelstr. 5

Pyridoxin-Derivate sowie deren Herstellung und Verwendung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die enteral und parenteral verabreichbaren Salze von Pyridoxin -5-phosphorsäureester mit Aminosäuren der allgemeinen Formel I



worin R die Hydroxymethyl- (-CH<sub>2</sub>OH), Aminomethyl-(-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) oder Formyl- (-CHO)-Gruppe und A Methylen (-CH<sub>2</sub>-) oder Äthylen (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) bedeutet, die Sequenz -A-COOH aber auch durch Methyl (-CH<sub>3</sub>) ersetzt sein kann, sowie deren Natrium-, Magnesium- und Calcium-Salze, die Herstellung dieser Verbindungen und die Verwendung derselben zur Prophylaxe und Therapie von Stoffwechselstörungen insbesondere zur Beeinflussung des Lipid- und Cholesterin-haushaltes.

609828/1002

BAD ORIGINAL



Seit 25 Jahren wird in den westlichen Industrieländern ein rapides Ansteigen von Stoffwechselstörungen, insbesondere Störungen des Fettstoffwechsels beobachtet, deren Hauptsache Ueberernährung bei gleichzeitiger Bewegungsarmut ist. Es bilden sich allmählich erhöhte Blutspiegel bestimmter Lipide aus, welche das Risiko arteriosklerotischer Herz- und peripherer Gefässerkrankungen erhöhen. Die Fette werden dabei im Kreislauf in Form kleinster Tröpfchen (Chylomikronen), die durch einen Proteinfilm ( $\alpha$ - oder  $\beta$ -Globulin) stabilisiert sind, transportiert.

Durch den reichlichen Fleischkonsum kommt es oft zu einem Ueberangebot von Cholesterin, da dieses Steroid bereits in ausreichender Menge in der menschlichen Leber biosynthetisiert wird. Der natürliche Regulationsmechanismus des Cholesterinspiegels wird bei fettreicher Ernährung gestört und es kommt zu einer dauernden Erhöhung des Plasmacholesterins. Das schwerlösliche Cholesterin lagert sich u.a. in den Gefäßwandschichten der Aorta, in der Hornhaut und Linse ab. Erhöhte Blutcholesterinspiegel sind mindestens zum Teil verantwortlich für die Entstehung von arteriellen Gefäßsklerosen. Hypercholesterinämie ist eine die Hyperlipämie stets begleitende Stoffwechselstörung, welche z.B. bei Diabetes mellitus sehr ausgeprägt sein kann.

Die pathogenetisch verschiedenen, symptomatisch ähnlichen Krankheitsbilder der Hypertriglyceridämie = Hyperlipämie, d.h. die Trübung des Serums durch Chylomikronen (neutralfettreiche Tröpfchen mit einem  $\varnothing$  von bis 1 nm) und die Hypercholesterinämie, d.h. die Erhöhung des Cholesteringehaltes im Blutplasma auf über 200 mg % werden unter den Sammelbegriffen Hyperlipoproteinämie bzw. Hyperlipidämie zusammengefasst. (Pschyrembel, Klin. Wörterbuch). Zur Therapie der Hyperlipoproteinämie werden bis heute vorwiegend  $\alpha$ -(p-Chlorphenoxy)-isobuttersäureäthylester, Salze von  $\alpha$ -(p-Chlorphenoxy)-isobuttersäure und Nikotinsäure sowie Nikotinsäure-Derivate und zahlreiche Kombinationspräparate verwendet.

$\alpha$ -(p-Chlorphenoxy)-isobuttersäure und dessen Derivate werden heute im Hinblick auf Wirksamkeit und Langzeitverträglichkeit als überragende Therapeutika für diese Indikation angesehen. Es kann jedoch nicht übersehen werden, dass es sich dabei um künstliche, körperfremde Chemikalien handelt, die im natürlichen Stoffwechsel nicht vorkommen. Sie können überdies mit der Zeit p-Chlorphenol freisetzen, eine Verbindung, die Chlor in stabiler aromatischer Bindung enthält. Gegen die breite Verwendung solcher naturfremder Stoffe über lange Zeiträume sind grundsätzliche Bedenken anzumelden, zumal die Dosierung von 1500 bis 2000 mg/Tag sehr hoch ist.

Die Verwendung von  $\alpha$ -(p-Chlorphenoxy)-isobuttersäure-Derivaten ist kontraindiziert bei bestehenden Leberschäden, Nierensuffizienz, Schwangerschaft, Stillzeit und bei Kindern. Sie können Diarrhoe, Alopezie und Leukopenie verursachen und zum Anstieg der Serum-Transaminase bzw. der Kreatinphosphokinase führen, welche die Absetzung dieser Medikamente erfordern. Eventuell muss unter der Medikation von  $\alpha$ -(p-Chlorphenoxy)-isobuttersäure-Derivaten die Dosierung von Antikoagulantien reduziert werden. Sie können auch zu Nausea, Gewichtszunahme, Potenzverminderung oder Myositis-ähnlichen Syndromen führen, welche ebenfalls zur Absetzung dieser Medikamente zwingen.

Nikotinsäure und Nikotinsäure-Derivate, die früher als Lipidsenker bedeutend waren, führen häufig zu Hautrötungen, abnormen Leberfunktionstesten und verschlimmern bestehenden Diabetes.

Im Gegensatz zu diesen synthetischen Medikamenten gehören Vitamin B<sub>6</sub>: Pyridoxol, Pyridoxamin und Pyridoxal und deren Derivate zu den natürlichen und essentiellen Nahrungsbestandteilen. Pyridoxin steht in naher Beziehung zu Pyridoxamin-5-phosphat und zu Pyridoxal-5-phosphat, das für den Stoffwechsel der Aminosäuren und Transaminierungsreaktionen ein wichtiges Koenzym ist.

ORIGINAL INSPECTED

609828/1002

Pyridoxal-phosphat ist ein Bestandteil der  $\alpha$ -Glukanphosphorylase. Nicht geklärt ist, ob sich Vitamin B<sub>6</sub> am Fettstoffwechsel beteiligt. Es wird ihm eine an der Arterienwand stattfindende Beeinflussung des Fettsäurestoffwechsels und damit eine antiarteriosklerotische Wirkung zugeschrieben. In höheren Dosen scheint es aber bei der Ratte eine leichte Erhöhung des Triglyceridspiegels des Blutes herbeizuführen, was einer antiarteriosklerotischen Wirkung von Vitamin B<sub>6</sub> widerspricht. Es soll auch die Fettverwertung und den Fettansatz begünstigen, ist von ausschlaggebender Bedeutung für den Eiweiß- bzw. Aminosäurestoffwechsel und hat eine wichtige Funktion bei der Bildung von Kohlenhydraten aus Eiweiß. Auch diese Erscheinungen widersprechen einer Beeinflussung des Fettstoffwechsels im Sinne einer hypolipidämischen oder hypocholesterinämischen Wirkung.

Von den Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure) ist eine hypolipidämische oder hypocholesterinämische Wirkung nicht bekannt. Im Tierversuch an der Ratte beeinflussen die Aminosäuren weder den Triglyceridspiegel noch den Cholesterinspiegel des Blutes.

Im Gegensatz dazu wurde nun gefunden, daß Pyridoxin-Derivate der allgemeinen Formel I auf Seite 1 beim Menschen eine überraschend schnelle und sehr starke hypolipidämische und hypocholesterinämische Wirkung ausüben, in einem Maße wie dies bisher nur von  $\alpha$ -(p-Chlorphenoxy)-isobuttersäure-Derivaten erreicht wurde. Bei der Behandlung mit Pyridoxin-Derivaten der allgemeinen Formel I wurden nie unerwünschte Nebenwirkungen beobachtet. Diese Verbindungen stellen demnach ideale Lipidsenker dar. Sie lassen sich bedenkenlos in all den Fällen anwenden, bei denen  $\alpha$ -(p-Chlorphenoxy)-isobuttersäure-Derivate oder Nikotinsäure und deren Derivate wegen ihren Kontraindikationen oder unerwünschten Nebenwirkungen und Begleiterscheinungen nicht oder nur unter entsprechenden strengen Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden dürfen.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel können sowohl enteral als Tabletten, Kapseln, Dragées, Granulate, Sirupe, Suspensionen oder Suppositorien als auch in Form von Injektionslösungen verabreicht werden.

Zur Behandlung und Vorbeugung krankhafter Abläufe der Biomorphose, insbesondere des Lipidhaushaltes, wie Stoffwechselent-

gleisungen und Gefäßveränderungen bei Arteriosklerose, diabetischen Gefäßveränderungen, Störungen der Netzhautdurchblutung und Arterienentzündungen werden im Durchschnitt täglich ca 80 bis 500 mg Wirkstoff verabreicht. Sie werden zu den Hauptmahlzeiten eingenommen.

#### Pharmakologische Prüfung

Die Pyridoxin-5'-phosphorsäureester-glutamate und -asparaginate sind ausserordentlich gut verträglich.

Die DL50 oral von Pyridoxal-5'-phosphorsäureester-glutaminat beträgt 6540 mg/kg Maus.

Die übrigen einschlägigen Verbindungen weisen ähnlich gute Verträglichkeiten auf. Durch ihre nahe Verwandtschaft bzw. ihre Zugehörigkeit zu der Vitamin B<sub>6</sub>-Gruppe einerseits und den natürlichen essentiellen Aminosäuren andererseits ist die Harmlosigkeit dieser Verbindungen sichergestellt. Auch bei Langzeittherapien ist mit Nebenwirkungen oder gar Schädigungen keinesfalls zu rechnen.

#### Klinische Prüfung

Bei 20 Patienten mit erhöhtem Triglycerid- oder Neutralfettspiegel und normalem oder erhöhtem Cholesterinspiegel des Blutserums wurde das Pyridoxal-5'-phosphorsäureester-glutaminat täglich in Dosen von 180 mg oral in Form von Tabletten verabreicht.

Die Patienten wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (1) von 7 Patienten wurde während 21 Tagen, die zweite Gruppe (2) von 13 Patienten wurde während 84 Tagen behandelt. Vor, während, sowie am Schluss der Behandlung wurden der Triglycerid-oder Neutralfettspiegel und der Cholesterinspiegel des Blutes bestimmt.

Die Resultate der biochemischen Bestimmungen im Patientenblut sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

Tabelle 1

	Triglyceride		Cholesterin	
	v o r Behandlg.	n a c h Behandlg.	v o r Behandlg.	n a c h Behandlg.
Mittelwert mg%	406,57	217,14	281,14	229,71
Senkung in %		46,59 %		18,29 %
S.D.	107,47	110,90	87,82	25,41
S.E.M.	40,62	41,91	33,19	9,60
Signifikanz		P<0,001	n.s. 0,10>P>0,05	
n = 7				

S.D. = Standard Deviation

S.E.M. = Standard Error of the Mean

Tabelle 2

	Neutralfett		n a c h 12 Wochen	Cholesterin		
	v o r Behandlg.	n a c h 8 Wochen		v o r Behandlg.	n a c h 8 Wochen	n a c h 12 Wochen
Mittelwert*	286,92	178,42		264,84	238,46	
Senkung in%		37,81 %			9,96 %	
S.D.	168,38	81,67		54,24	51,28	
S.E.M.	46,70	22,65		15,04	14,22	
Signifikanz		P<0,01			P<0,005	
	n = 13			n = 13		
Mittelwert*		179,06	123,55		237,50	232,75
Senkung in%			30,99 %			2,0 %
S.D.		78,69	39,84		53,43	58,05
S.E.M.		23,72	12,01		15,42	16,75
Signifikanz			P<0,02		n: 5 0,10>P>0,05	
	n = 11			n = 12		
Mittelwert*	287,48		123,55	264,00		232,75
Senkung in%			57,02 %			11,83 %
S.D.	177,33		39,84	56,57		58,05
S.E.M.	53,46		12,01	16,33		16,75
Signifikanz			P<0,02			P<0,01
	n = 11			n = 12		
*in mg%						

# Ergebnisse

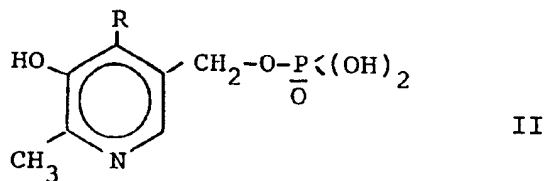
Gruppe (1): Siehe Tabelle 1. Innerhalb von 21 Tagen wurden mit 180 mg Wirkstoff pro Tag eine Senkung des Triglyceridspiegels um 189,4 mg% erzielt, was einer prozentualen Senkung um 46,6 % entspricht. Die vorher erhöhten Triglyceridwerte des Blutes wurden signifikant gesenkt ( $p < 0,001$ ). Bei dieser Patientengruppe wurden auch die Cholesterin-Werte, die vorher nicht oder nur geringfügig erhöht waren, um 18,3 % reduziert. Die Reduktion war jedoch nicht signifikant ( $0,10 > p > 0,05$ ).

Gruppe (2): Siehe Tabelle 2. Bei dieser Gruppe wurde in 84 Tagen der Neutralfettspiegel um 57,02 % und der Blutcholesterinspiegel um 11,83 % gesenkt. Die Reduktion der Neutralfettspiegel war sowohl nach 8 als auch nach 12 Wochen signifikant ( $p < 0,01$ ). Auch die Senkung des Cholesterinspiegels war sowohl nach 8 Wochen ( $p < 0,005$ ) als auch nach 12 Wochen signifikant ( $p < 0,01$ ) gegenüber den vor der Behandlung erhaltenen, meistens über die Norm erhöhten Werte.

Mit Pyridoxol-5'-phosphorsäureester-glutaminat und Pyridoxamin-5'-phosphorsäureester-glutaminat wurden ähnliche Resultate erzielt.

Auch die entsprechenden Asparaginate bewirkten eine Senkung des erhöhten Fett- und Cholesterinspiegels im Plasma bei Versuchen an Ratten.

Das Verfahren zur Herstellung der eingangs definierten Verbindungen der allgemeinen Formel I sowie deren Natrium-, Magnesium- und Calciumsalze ist dadurch gekennzeichnet, dass man einen Pyridoxin-5'-phosphorsäureester der allgemeinen Formel II



worin R die Hydroxymethyl-, Aminomethyl- oder Formyl-gruppe bedeutet, oder ein Natrium-, Magnesium- oder Calcium-Salz davon, mit der äquimolaren oder annähernd äquimolaren Menge Glutaminsäure oder Asparaginsäure umgesetzt.

Diese Salzbildung wird gewöhnlich in Wasser oder in einem Alkohol oder einem aprotischen Lösungsmittel durchgeführt.

Entsprechend der relativen Empfindlichkeit der Eddukte und Produkte wird die Salzbildung bei niedrigen Temperaturen etwa im Bereiche von 0 bis 50° C und unter weitgehendem Lichtausschluss durchgeführt.



## BEISPIELE

### [A] Herstellung der Wirkstoffe

#### Beispiel 1

Pyridoxal-5'-phosphorsäureester-glutaminat. Mol. Gew: 394,3

26,52 g (0,1 Mol) Pyridoxal-5'-phosphat-monohydrat werden unter Lichtschutz in eine 40 - 50° C warme Suspension aus 14,7 g Glutaminsäure in ca 1 lt Wasser eingetragen. Es wird so lange gerührt, bis völlige Auflösung eingetreten ist. Nun wird die Lösung im Vakuum bei niedriger Temperatur vollständig eingedampft. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 39,4 g intensiv gelb gefärbtes Pulver.

Schmelzpunkt: 135° C sintern, anschliessend allmähliche Zersetzung.

Löslichkeiten: Leicht löslich in Wasser mit schwach saurer Reaktion, löslich in Methanol, wenig löslich in Äthanol, unlöslich in Chloroform, Benzol und Benzinen.

Spektrum: Breites Maximum bei 290-295 nm  
(in H<sub>2</sub>O)

#### Beispiel 2

Pyridoxal-5'-phosphorsäureester-asparaginat. Mol. Gew: 380,3

26,52 g Pyridoxal-5'-phosphat-monohydrat werden in eine warme Suspension von 13,3 g Asparaginsäure in 600 ml Methanol eingetragen und gerührt, bis völlige Auflösung eingetreten ist.

Durch Zusatz von 1,2 lt Isopropanol wird das Produkt ausgefällt, abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 30 g d.s. 79 % der Theorie.

Schmelzpunkt: 135° C sintern, dann allmähliche Zersetzung.

Löslichkeiten: Leicht löslich in Wasser, löslich in Methanol, schwer löslich in Äthanol und Isopropanol, unlöslich in Diäthyläther.

Spektrum: Breites Maximum bei 290-295 nm  
(in H<sub>2</sub>O)

Die Salze von Pyridoxal-5-phosphat mit Aminosäuren sind intensiv gelb gefärbte Pulver.

Beispiel 3

Pyridoxamin-5-phosphorsäureester-glutaminat Mol. Gew: 395,3

24,8 g (0,1 Mol) Pyridoxamin-5-phosphat [Peterson et al, J.Amer.chem.Soc. 76(1954)170] werden in eine Suspension von 14,7 g Glutaminsäure in 1 lt Wasser eingetragen, bis zur völligen Auflösung gerührt und danach bei tiefer Temperatur im Vakuum vollständig eingedampft.

Ausbeute: 26,3 g hygroskopisches Pulver.

Löslichkeiten: Leicht löslich in Wasser, wenig löslich in höheren Alkoholen und den meisten organischen Lösungsmitteln.

Analog wird auch erhalten:

Pyridoxamin-5-phosphat-asparaginat, Mol.Gew: 381,3

Beide Verbindungen sind leicht löslich in Wasser. Die Lösungen reagieren annähernd neutral.

Beispiel 4

Pyridoxol-5-phosphorsäureester-glutaminat Mol. Gew:

2,5 g Pyridoxol-5-phosphat (2-Methyl-3-hydroxy-4-hydroxy-methyl-5-pyridinmethyl-phosphorsäure) [Peterson et al, J.Amer.chem.Soc. 76(1954)172] werden in eine Lösung von 1,47 g Glutaminsäure in 40 - 50° C warmem Wasser unter Lichtschutz eingetragen und so lange gerührt, bis vollständige Auflösung eingetreten ist. Das Wasser wird anschliessend durch Gefriertrocknung entfernt.

Ausbeute: 4 g weisses Pulver.

Löslichkeiten: Leicht löslich in Wasser, löslich in Methanol, wenig löslich in höheren Alkoholen und den meisten organischen Lösungsmitteln.

2461742

[B] Formungsbeispiele

Die unter [A] beschriebenen Wirkstoffe werden zu Tabletten, Kapseln, Dragées, Granulaten, Sirupen, Suspensionen, Suppositorien oder zu Injektionslösungen verarbeitet.

Beispiel 5

Tabletten enthaltend je 60 mg Pyridoxal-5'-phosphorsäure-ester-glutaminat.

---

6000 g Pyridoxal-5'-phosphatsäureester-glutaminat werden mit 2 lt Stärkekleister, welcher 100 g Maisstärke enthält, in einer Knetmaschine angeteigt. Wenn die feuchte Masse klebrig ist, wird sie mit etwas trockener Stärke versetzt. Danach wird sie in einer Granuliermaschine granuliert und im Vakuum getrocknet. Das fertige Granulat wird danach mit 0,5 kg Maisstärke und 25 g Magnesiumstearat vermischt und zu Tabletten mit einem Wirkstoffgehalt von 60 mg verpresst. Die Tabletten können anschliessend noch dragiert werden.

Beispiel 6

Kapseln enthaltend je 80 mg Pyridoxal-5'-phosphorsäure-ester-glutaminat.

---

Der Wirkstoff wird mit wenig Maisstärke und Magnesiumstearat vermischt und in Kapseln abgefüllt.

Beispiel 7

Injektionslösung enthaltend je 100 mg Pyridoxal-5'-phosphorsäureester-glutaminat.

---

100 g Pyridoxal-5'-phosphorsäureester-glutaminat werden in 200 ml Wasser gelöst, durch Zusatz von wenig Natriumhydroxid auf pH  $7,0 \pm 0,2$  eingestellt, durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,22  $\mu$ m filtriert auf ein Volumen von genau 300 ml gebracht und unter sterilen Bedingungen

609828/1002

in Portionen von je 3 ml in Ampullen abgefüllt und anschliessend lyophilisiert. Die Ampullen werden zugeschmolzen. Vor Gebrauch wird das Lyophilisat mit jeweils 2,5 ml Wasser versetzt, durch Schütteln in Lösung gebracht, mit der Injektionsspritze aufgesogen und intramuskulär verabreicht.

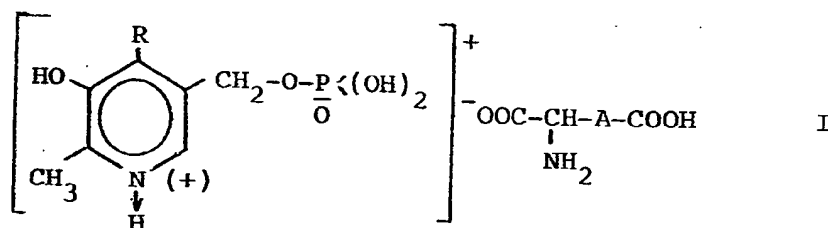
[C] Anwendungsbeispiele

Pyridoxal-, Pyridoxamin- oder Pyridoxol-5'-phosphorsäureester-glutamate oder entsprechende Asparaginate werden zur Behandlung oder Vorbeugung von Hyperlipoproteinämie in Dosen von 80 bis 500 mg pro Tag verabreicht. Höhere Dosen geben keine verstärkte Wirkung und sind daher sinnlos. Gewöhnlich werden etwa 150 - 250 mg pro Tag verteilt auf 2 - 3 Einnahmen bei den Mahlzeiten oral in Kapseln oder Dragées verabreicht. Die Wirkung der Behandlung mit diesen Wirkstoffen ist auf Seiten 5 - 8 und in den Tabellen 1 und 2 quantitativ nachgewiesen.

2461742

Patentansprüche

1. Salze von Pyridoxin-5'-phosphorsäureester mit Aminosäuren der allgemeinen Formel I



worin R die Hydroxymethyl-, Aminomethyl- oder Formylgruppe und A Methylen oder Äthylen bedeutet, die Sequenz -A-COOH aber auch durch -CH<sub>3</sub> ersetzt sein kann, sowie die Natrium-, Magnesium- und Calciumsalze dieser Phosphorsäureester.

2. Pyridoxal-5'-phosphorsäureester-glutaminat sowie dessen Natrium-, Magnesium- oder Calciumsalz.
3. Pyridoxal-5'-phosphorsäureester-asparaginat.
4. Pyridoxamin-5'-phosphorsäureester-glutaminat oder -asparaginat.
5. Pyridoxol-5'-phosphorsäureester-glutaminat oder -asparaginat.
6. Das Verfahren zur Herstellung der im Patentanspruch 1 definierten Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Pyridoxin-5'-phosphorsäureester oder ein Natrium-, Magnesium- oder Calciumsalz davon, mit der äquimolaren oder annähernd äquimolaren Menge Glutaminsäure oder Asparaginsäure umsetzt.

609828/1002

ORIGINAL INSPECTED

## NACHGEREICHT

7. Verfahren nach Patentanspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung in Wasser, in einem Alkohol oder in einem aprotischen Lösungsmittel bei einer 50° C nicht oder nicht wesentlich übersteigenden Temperatur durchführt.
8. Pharmazeutisches Präparat zur enteralen oder parenteralen Behandlung oder Vorbeugung von Hyperlipoproteinämien, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff ein Pyridoxin-5'-phosphorsäureester-glutaminat oder -asparaginat der allgemeinen Formel I im Patentanspruch 1 oder deren Natrium-, Magnesium- oder Calciumsalze enthält.
9. Tabletten, Kapseln oder Suppositorien geeignet zur therapeutischen Behandlung von Hyperlipoproteinämie, dadurch gekennzeichnet, dass sie ca 50 bis 250 mg eines Salzes einer Pyridoxin-5'-phosphorsäure mit Glutaminsäure oder Asparaginsäure und geeignete pharmazeutische Binder oder Trägerstoffe (Exzipientia) enthält.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**